

Extrapolation des bioréacteurs (*Bioreactor scale-up*)

Frank Delvigne

Gembloux Agro-Bio Tech – University of Liège
Unité de bio-industries
Passage des Déportés, 2
5030 Gembloux, Belgique

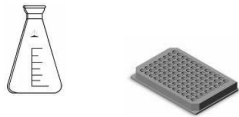
Synopsis

1. Introduction
2. Caractérisation des hétérogénéités spatiales des bioréacteurs
3. Caractérisation de l'hétérogénéité des populations microbiennes
4. Application : production d'une protéine hétérologue chez *E. coli*
5. Influence du *scale-up* sur l'excrétion de protéines

1. Introduction

Schéma général de développement d'un bioprocédé microbien

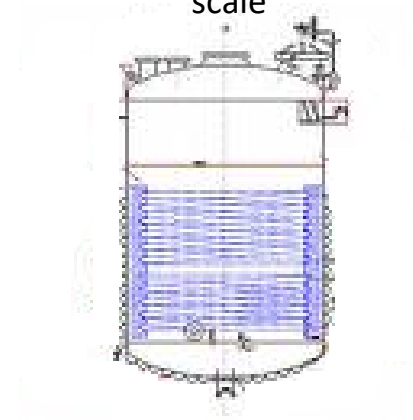
Shaken bioreactors – lab-scale



Stirred bioreactor – lab-scale



Stirred bioreactor – industrial scale



Reactor dimension (D)

- Epuration des eaux
- Biogaz
- Biocarburant
- Acides organiques
- Alcools
- Acides aminés
- Enzymes
- Polymères
- Arômes
- Antibiotiques
- Protéines recombinantes



Prix de
revient

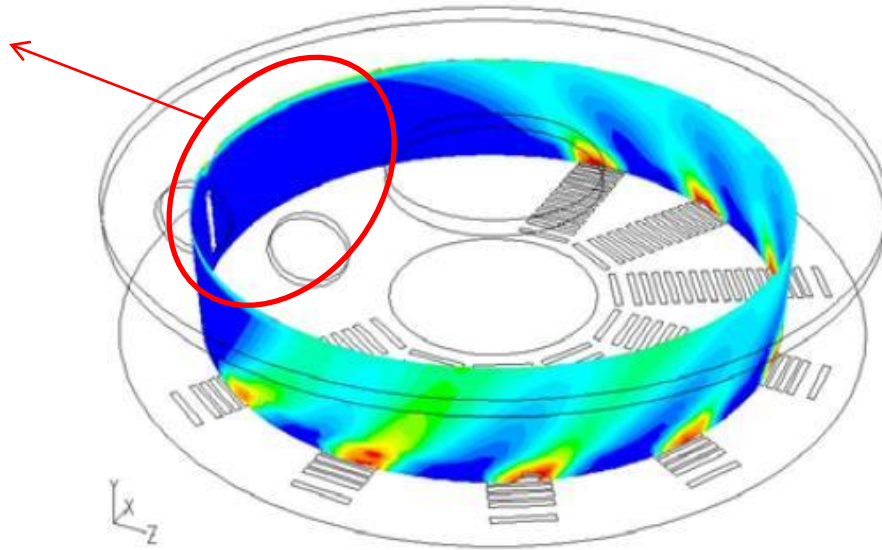


Volume du
réacteur

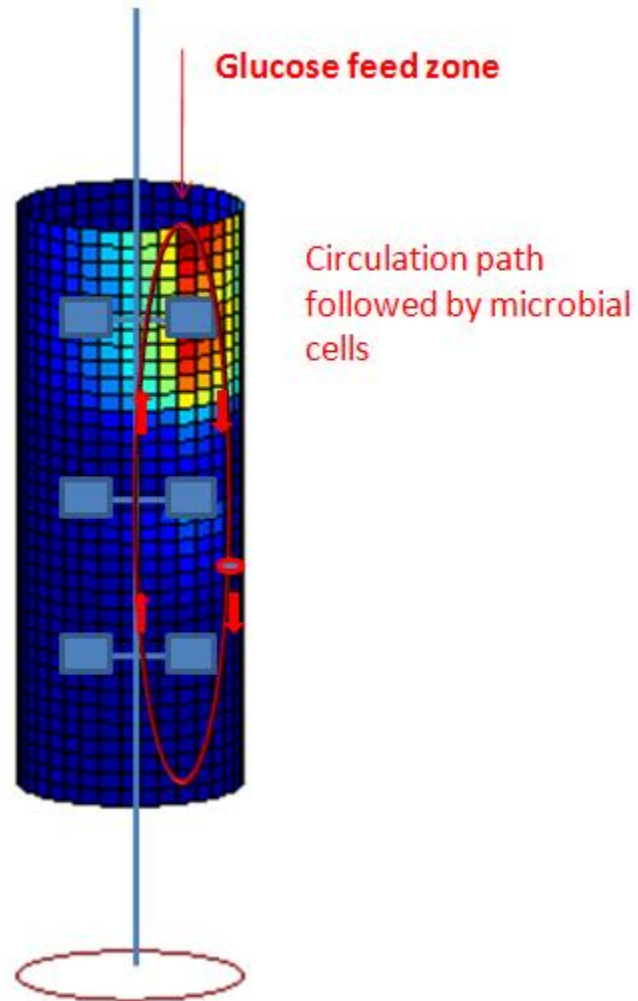
Les procédures d'extrapolation seront différentes en fonction du produit visé

Intégration des gradients de concentration : exemple de l'épuration des eaux

Zones avec
limitation en
oxygène dissous
permettant la
dénitrification

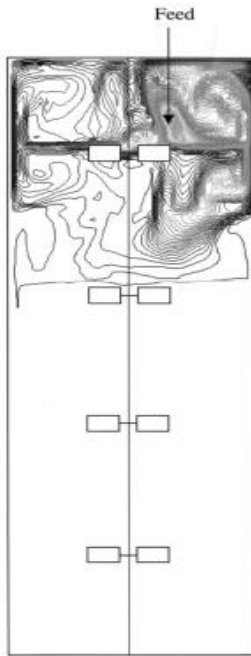


Perte de contrôle des gradients de concentration : exemple d'une production *fed-batch*



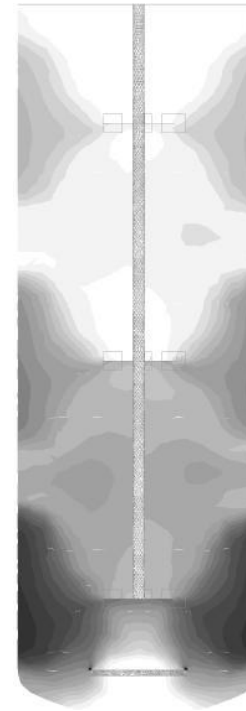
2. Caractérisation de l'hétérogénéité des bioréacteurs

Gradient de substrat dans les
procédés *fed-batch*

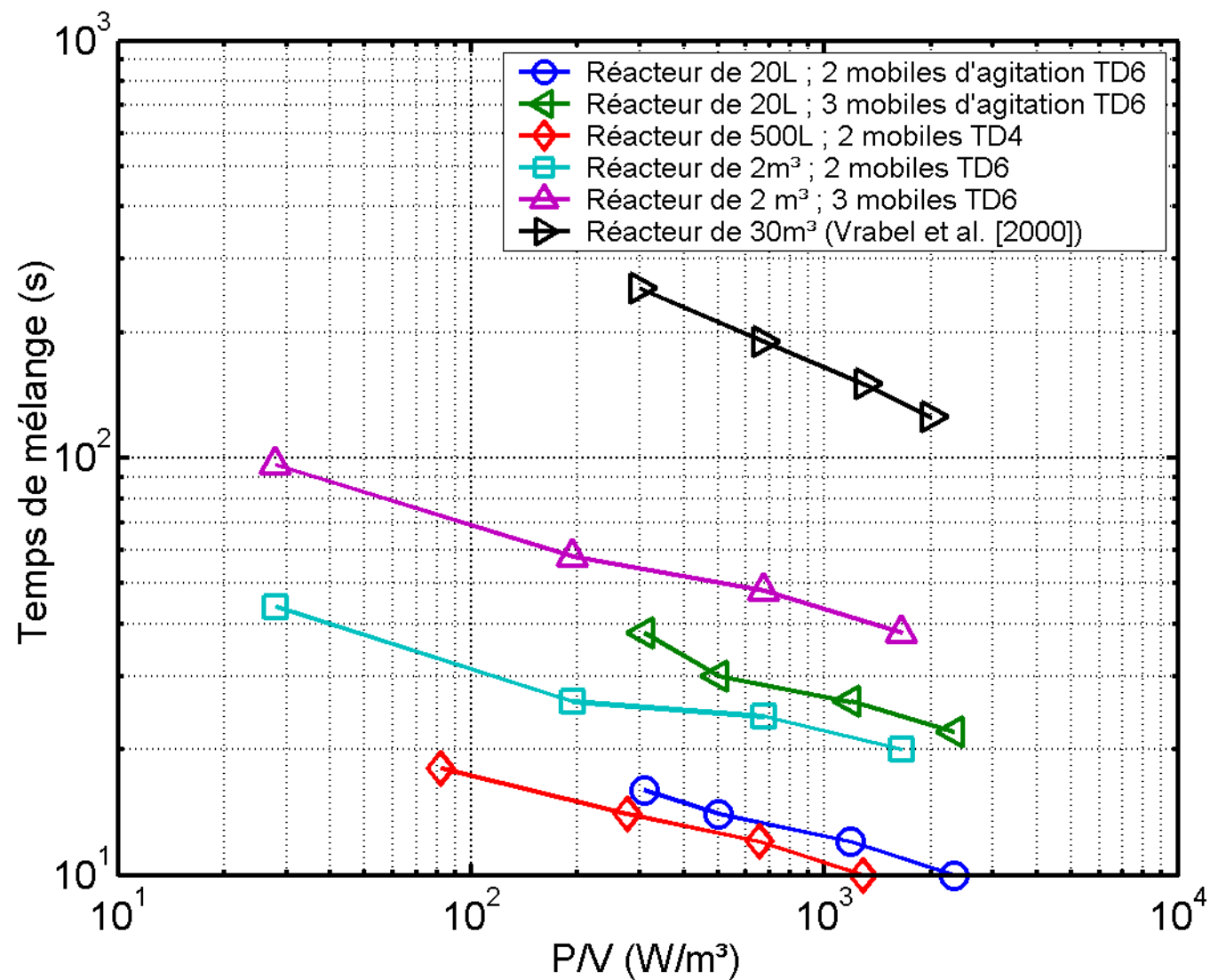
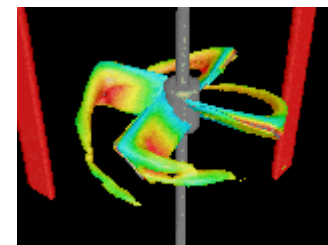


Enfors *et al.* [2001] Journal of
biotechnology

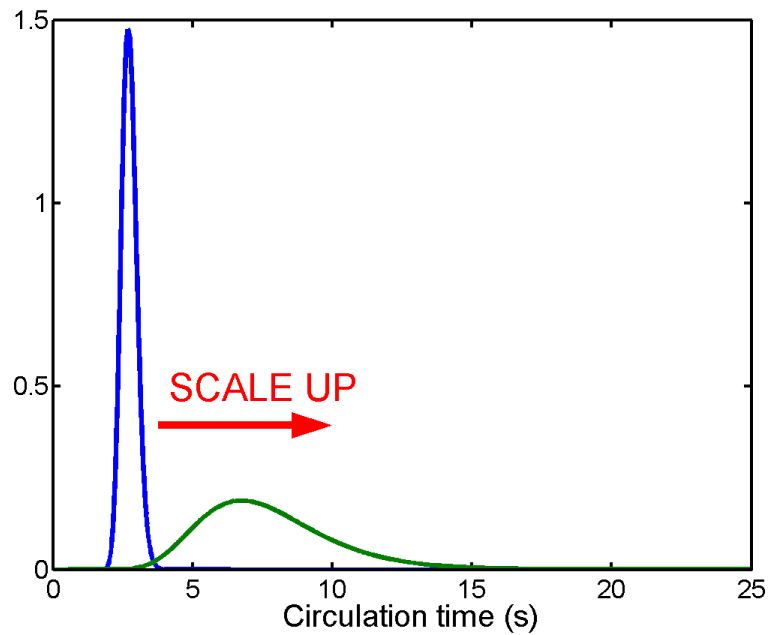
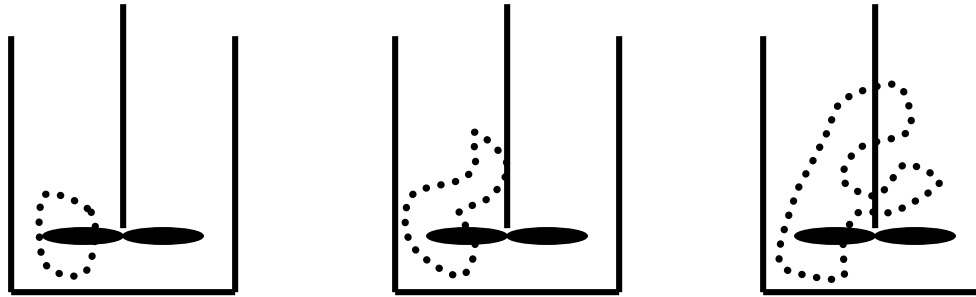
Gradient en oxygène dissous
dans les procédés aérobies



Schütze *et al.* [2006] 12th
European Conference on Mixing

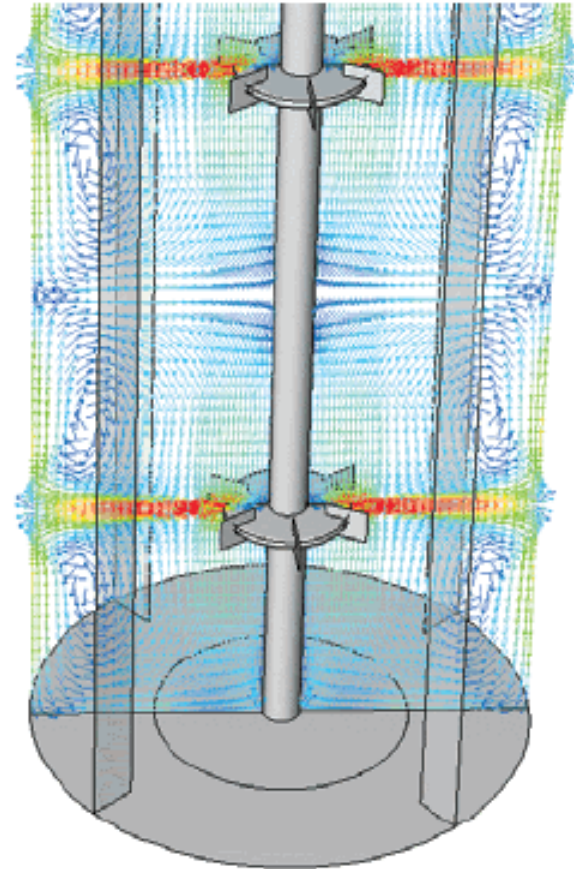
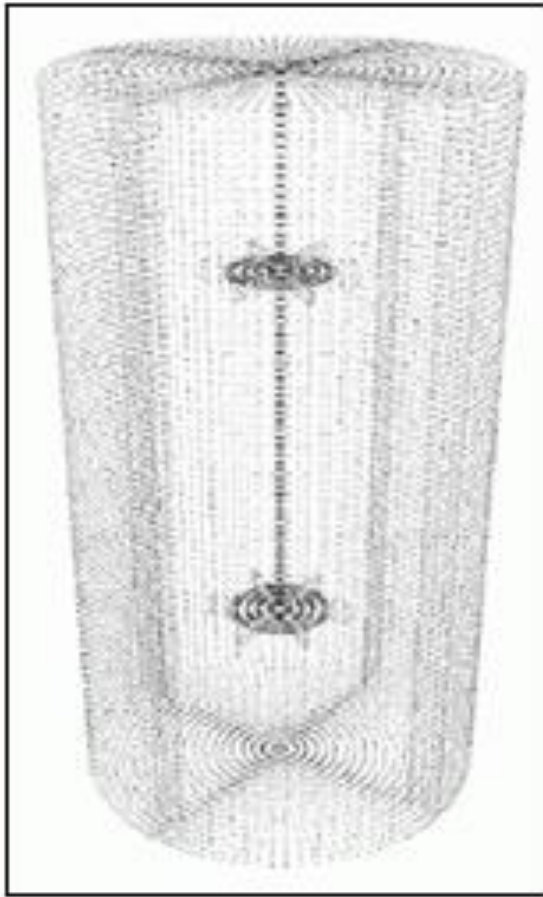


Apparition de facteurs aléatoires



Caractérisation des gradients de concentration par modélisation numérique

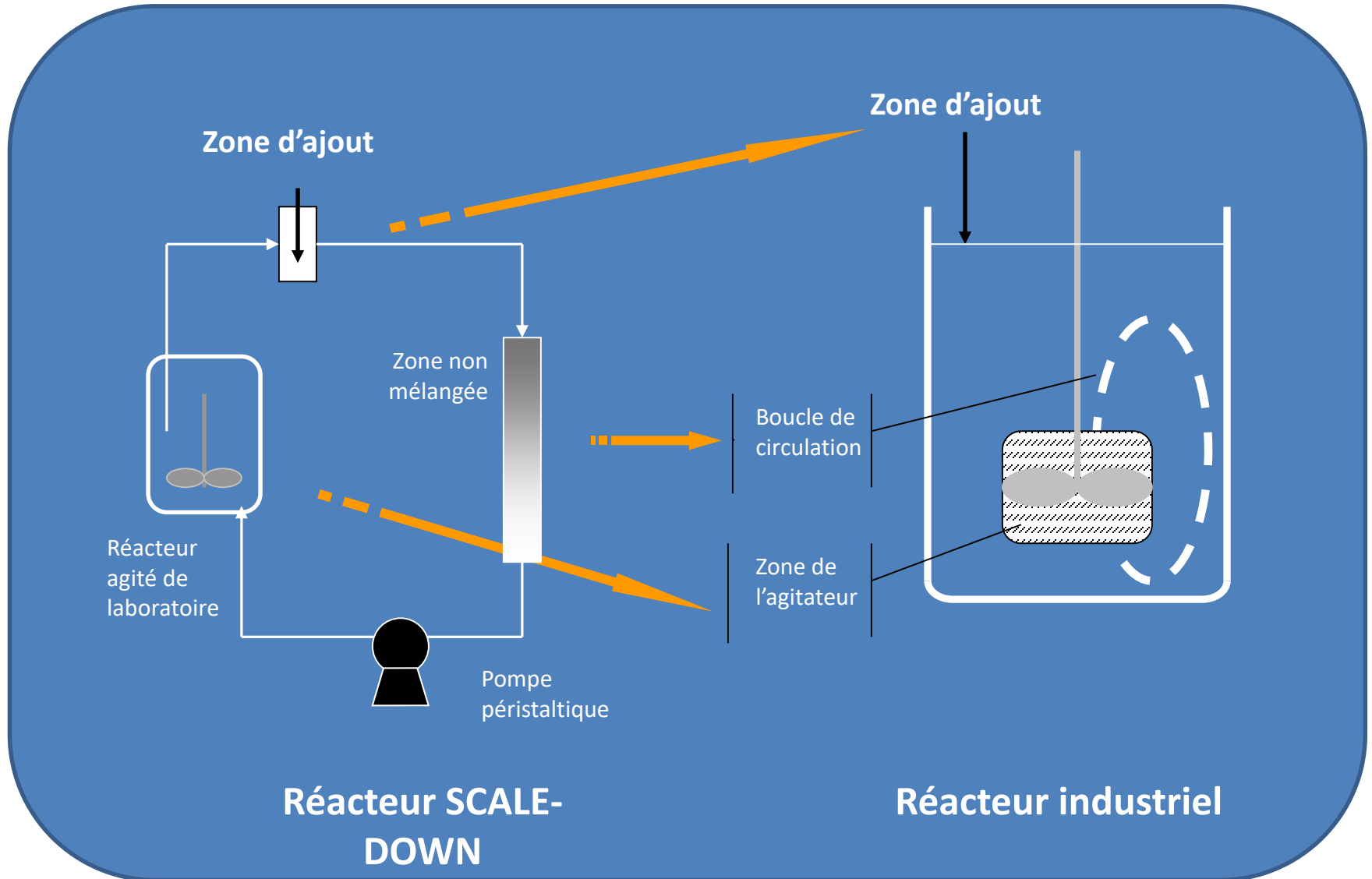
Mécanique des fluides numériques



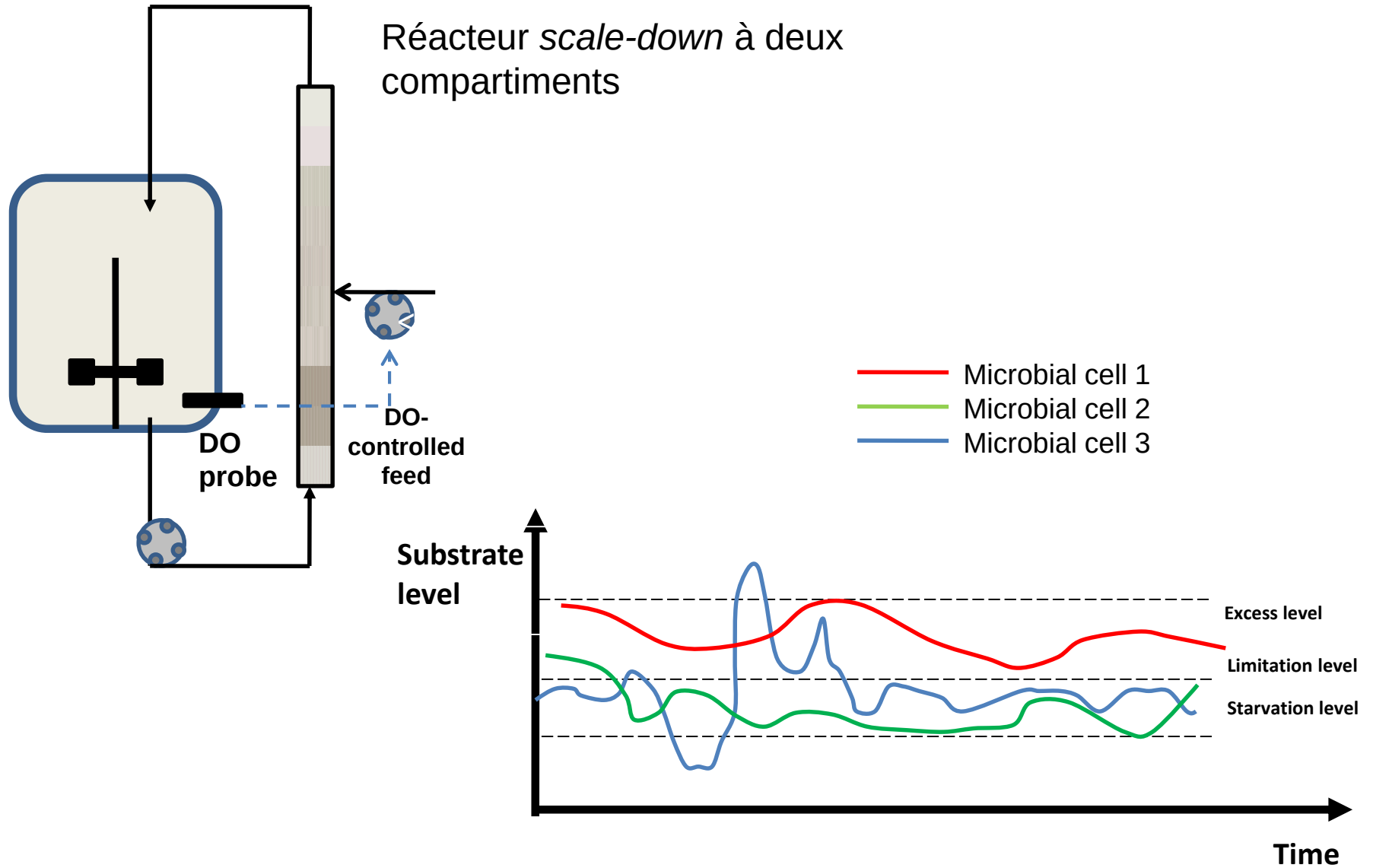
Demande importante en puissance de calcul et difficile à coupler avec la physiologie microbienne

Approche *scale-down*

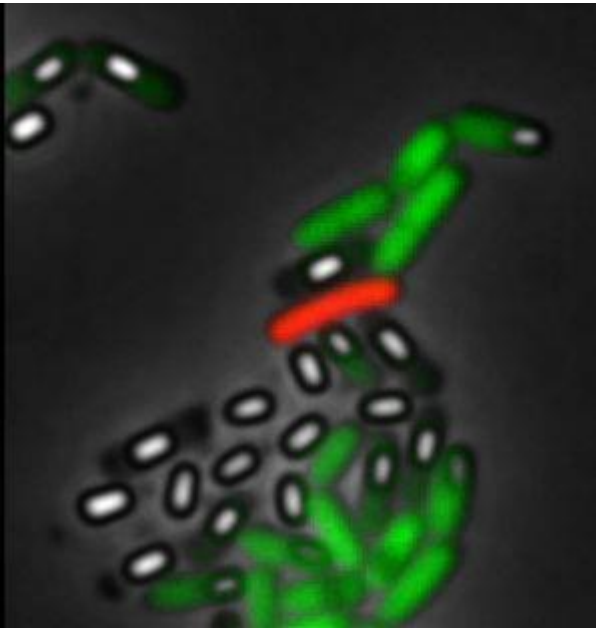
Comment reproduire à l'échelle du laboratoire les défauts d'écoulement des bioréacteurs industriels ?



Circulation des cellules microbiennes dans les réacteurs *scale-down*

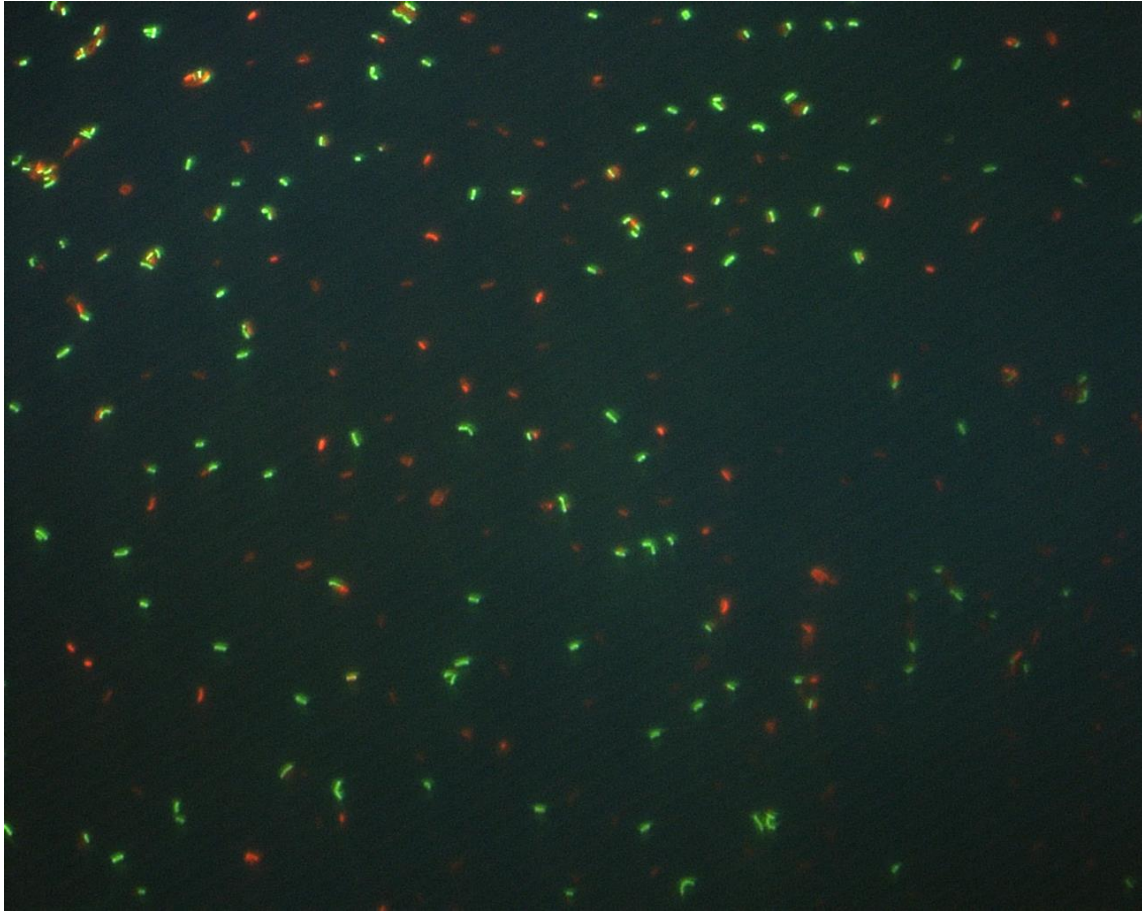


3. Caractérisation de l'hétérogénéité des populations microbiennes



Exemple d'une culture pure de *Bacillus subtilis* dans des conditions homogènes. Les cellules portent un double rapporteur vert/rouge. Les cellules vertes montrent une croissance normale, les cellules rouges montrent un réarrangement vers un état de compétence. Les cellules non colorées sont des spores. Au sein d'une population dite clonale, les systèmes rapporteurs permettent de mettre en évidence les mécanismes de bistabilité.

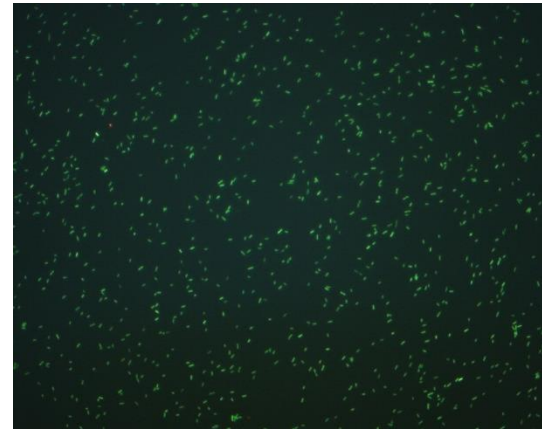
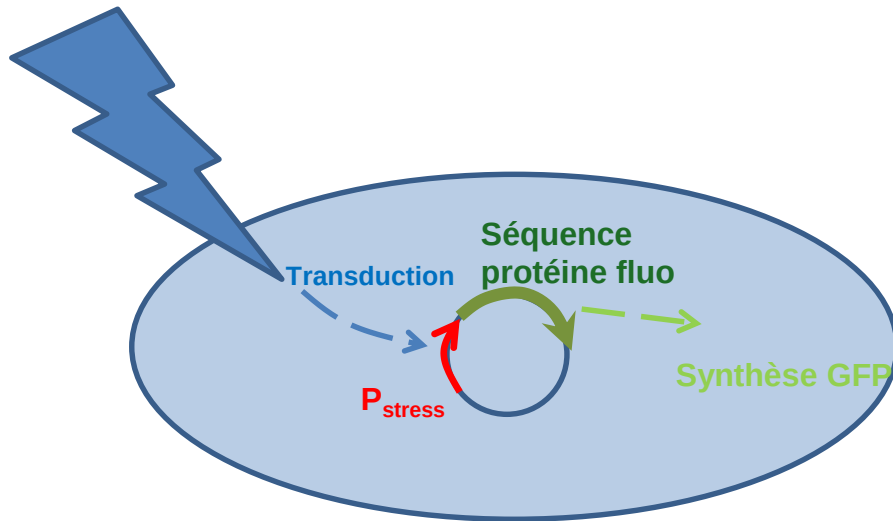
Test LIVE/DEAD pour le suivi d'un procédé de production de bactéries lactiques



Double coloration
cFDA/PI

3.1. Méthodes permettant d'estimer l'hétérogénéité d'une population microbienne : système rapporteur fluorescent

Stimulus extracellulaire (S, O₂, pH)



Différents variants sont disponibles pour le suivi simultané de plusieurs gènes



Source de bistabilité : fluctuations intrinsèques et extrinsèques

Schéma réactionnel type : activation d'un gène

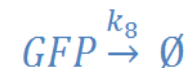
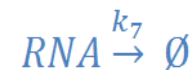
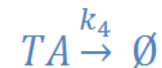
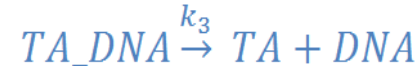
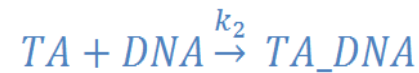
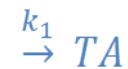
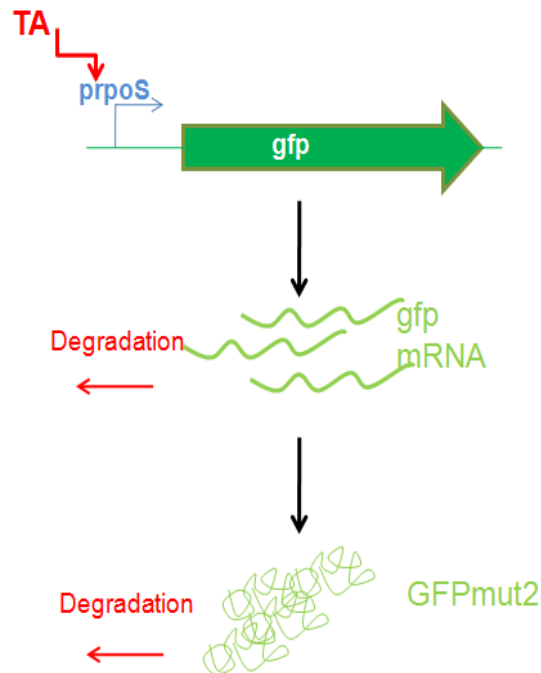
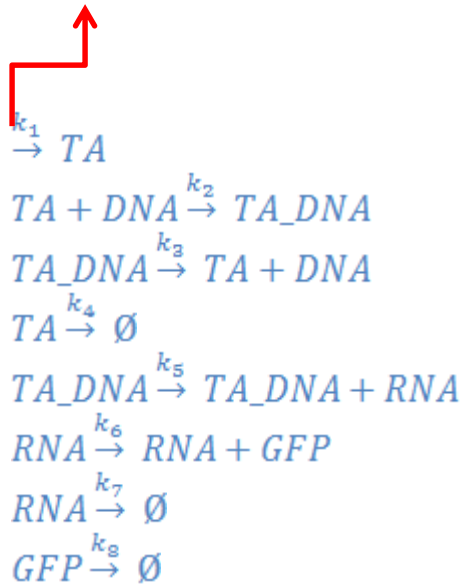


Schéma réactionnel :

Stimulus



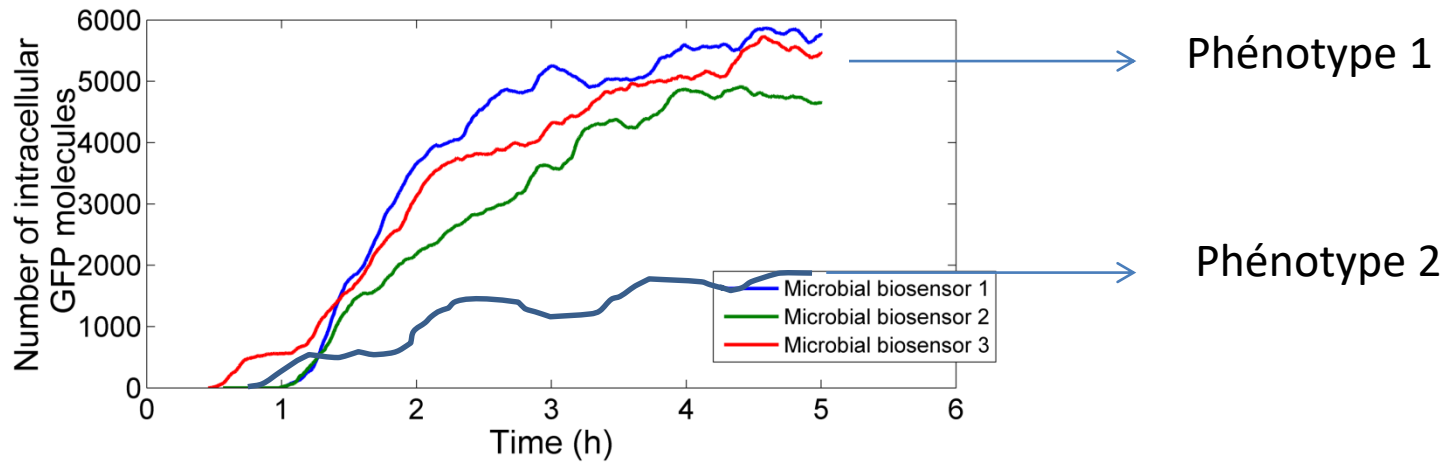
**Temps de
génération : $k_8 =$
 $\log(2)/t_g$**

Au niveau mathématique :
système d'équations différentielles

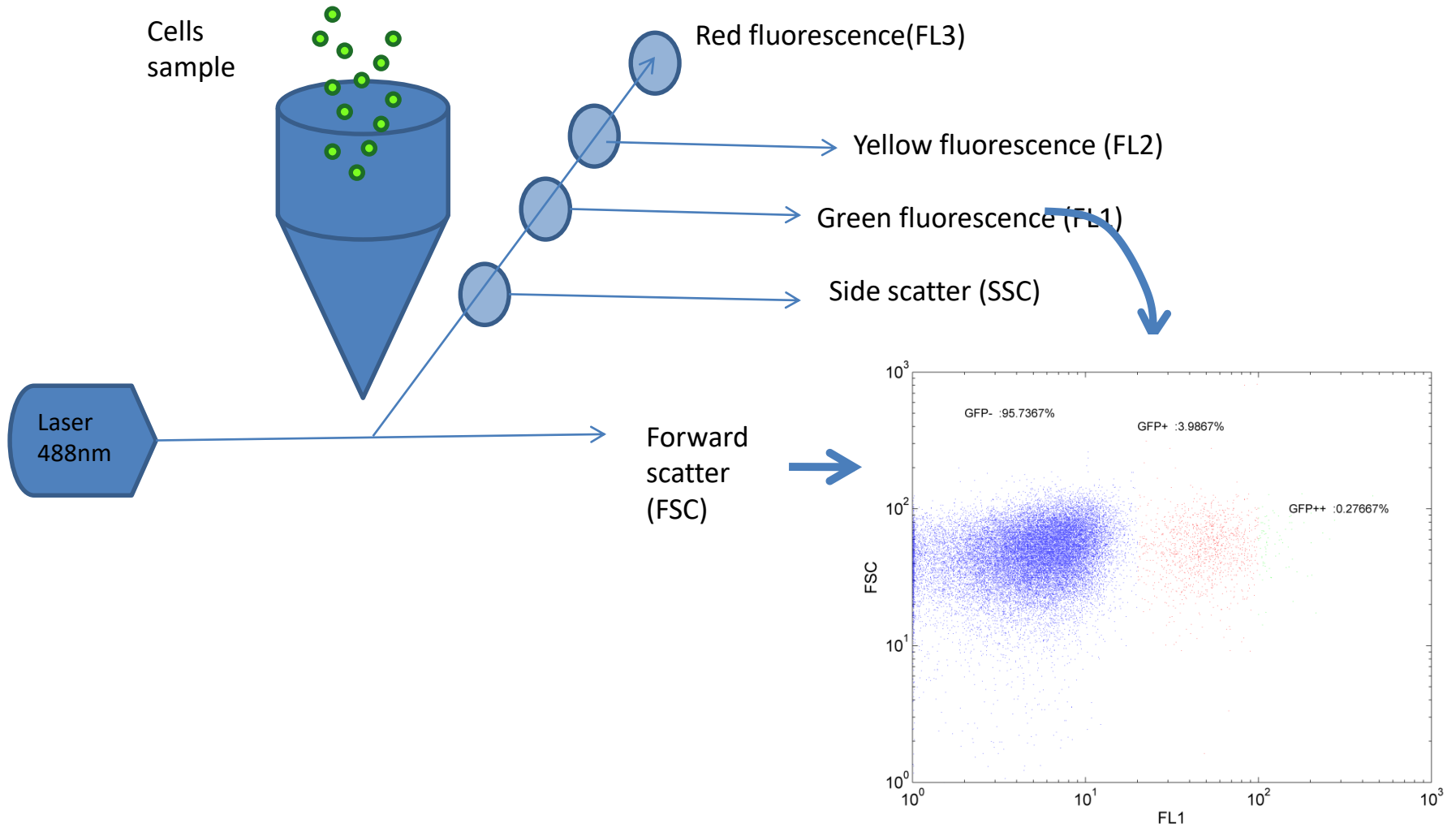
$$\begin{aligned} \frac{dTA}{dt} &= k_1 - k_2.TA.DNA - k_4.TA + k_3.TA\_DNA \\ \frac{dTA\_DNA}{dt} &= k_2.TA.DNA - k_5.TA\_DNA - k_3.TA\_DNA \\ \frac{dDNA}{dt} &= k_3.TA\_DNA - k_2.TA.DNA \\ \frac{dRNA}{dt} &= k_5.TA\_DNA - k_6.RNA - k_7.RNA \\ \frac{dGFP}{dt} &= k_6.RNA - k_8.GFP \end{aligned}$$


$$GFP_{steady-state} = RNA_{steady-state} \cdot \left(\frac{k_6}{k_8}\right)$$

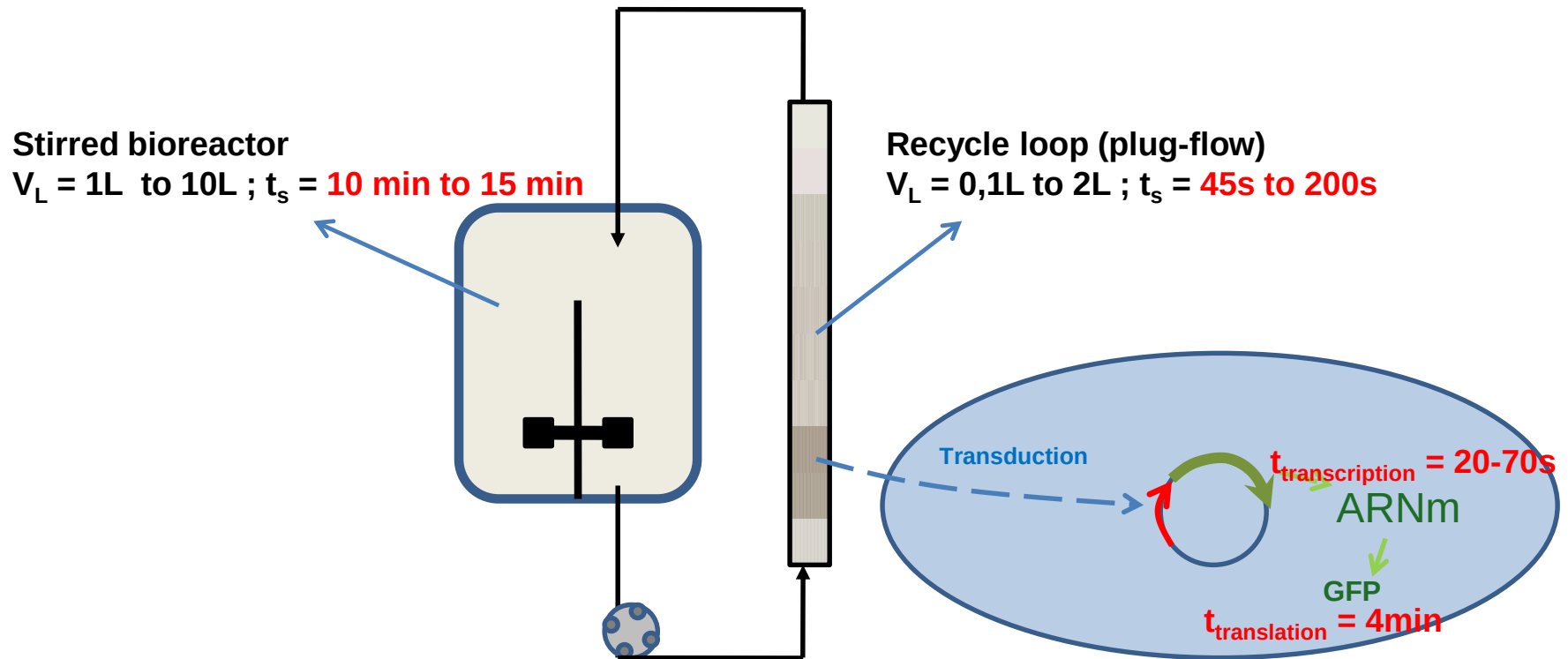
Petit volume cellulaire, faible nombre de réactif : effet aléatoire des réactions



3.2. Méthodes de détection : cytométrie en flux



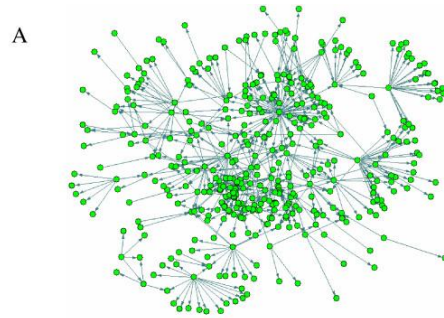
4. Application : production d'une protéine hétérologue chez *Escherichia coli*



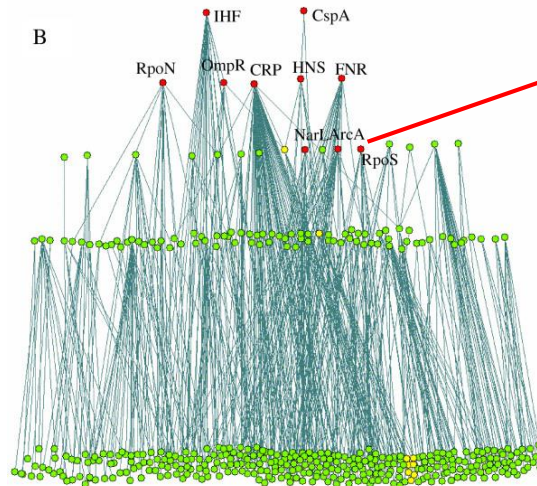
Choix d'un promoteur de stress

Exemple pour *E. coli* : environ 4000 ORFs :

Réseau d'interaction



Réseau d'interaction
avec classification
hiérarchique

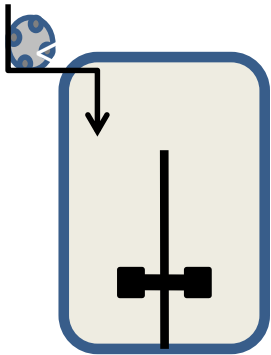


Promoteurs de stress gouvernant
l'induction/répression de
plusieurs centaines de gènes
(master regulator)
Exemple : *rpoS* réponse générale
au stress

Contraintes liées au procédé :

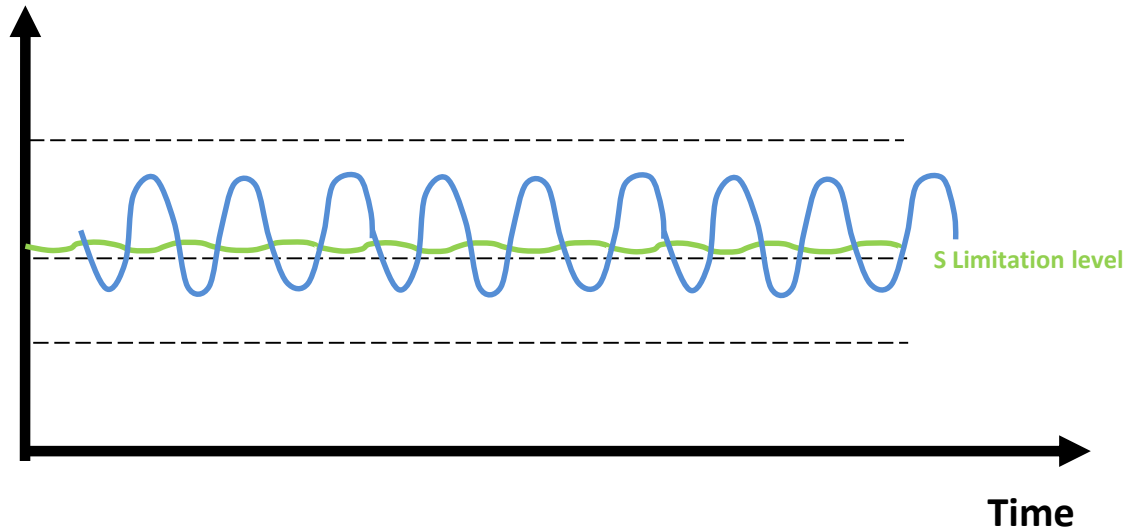
- Eviter les excès de glucose (acétate) et les carences (phase stationnaire)
 - Eviter les carences en oxygène dissous (lactate, formate,...)
- Alimentation en mode *fed-batch*

Exponential/constant
feed

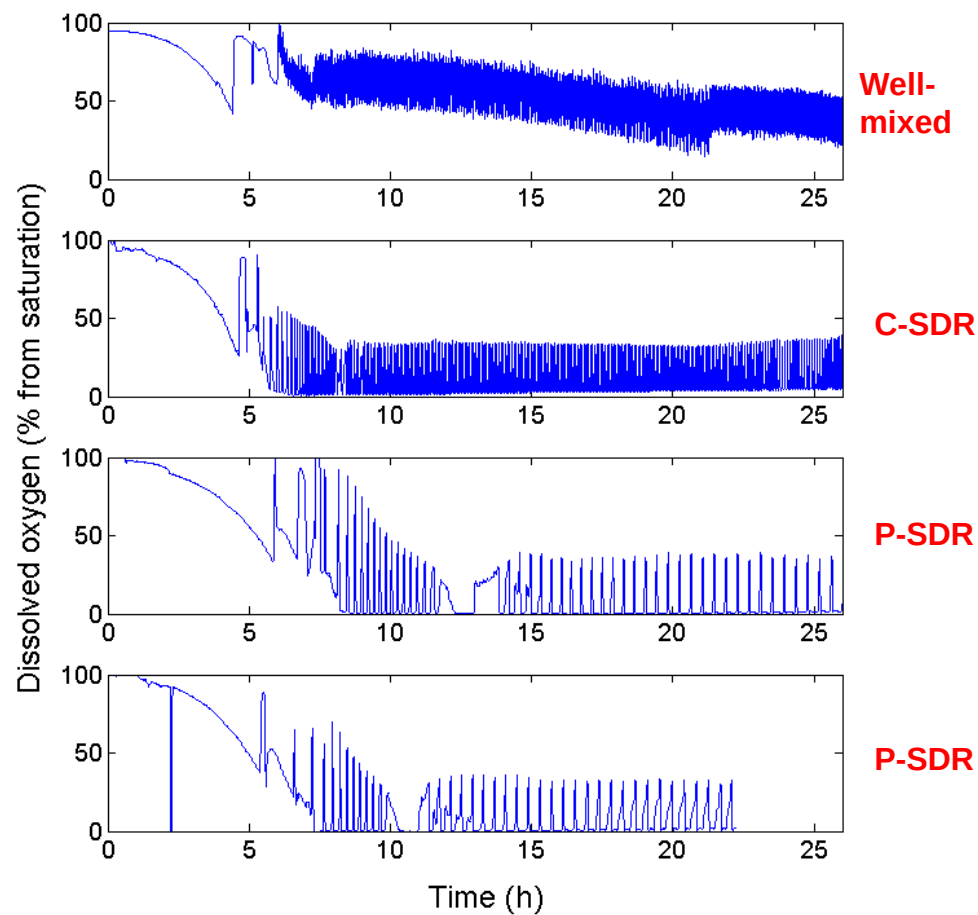
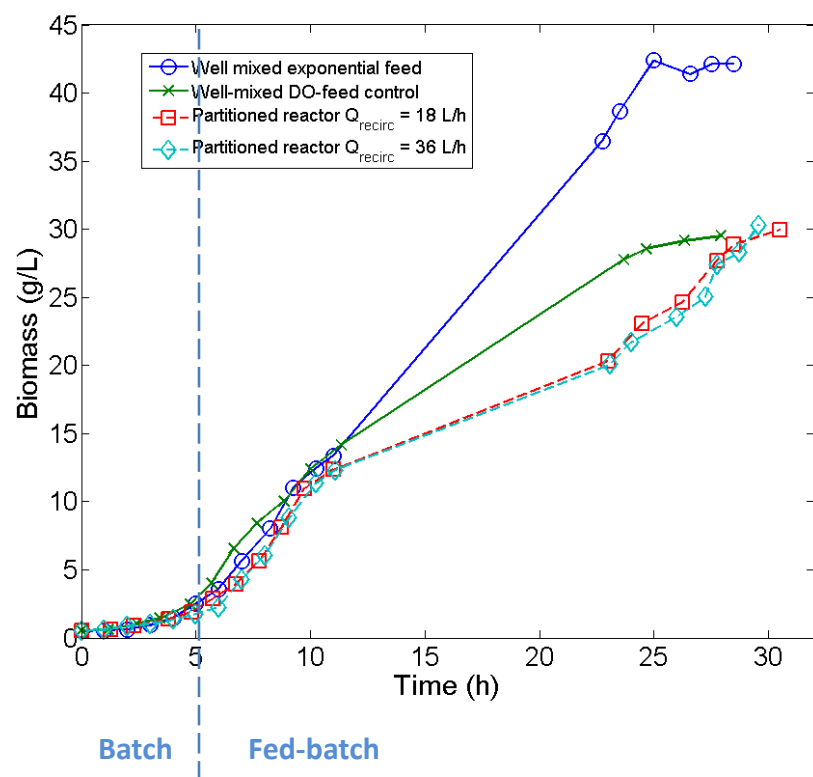


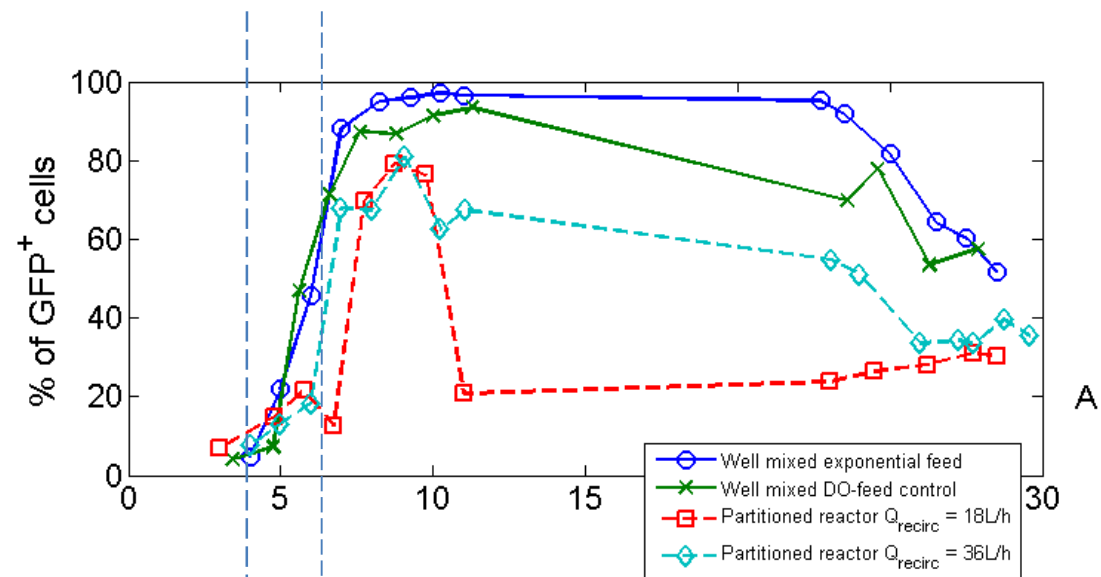
Substrate
level

Oxygen
level

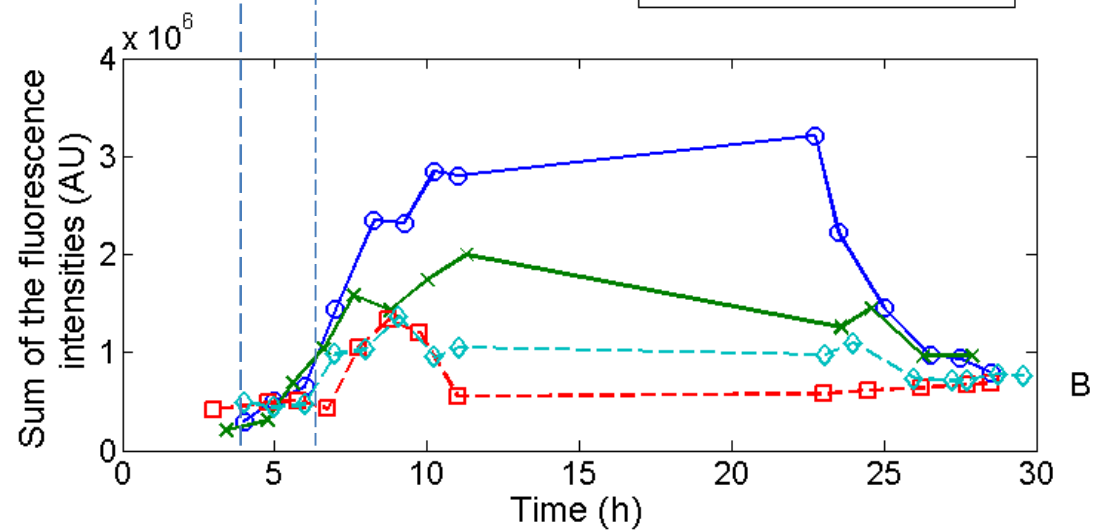


- **Au niveau industriel** : perte partielle du contrôle du profil d'ajout en glucose (apparition de gradients)
- **Au niveau laboratoire** (screening de souches microbienne) : aucun contrôle

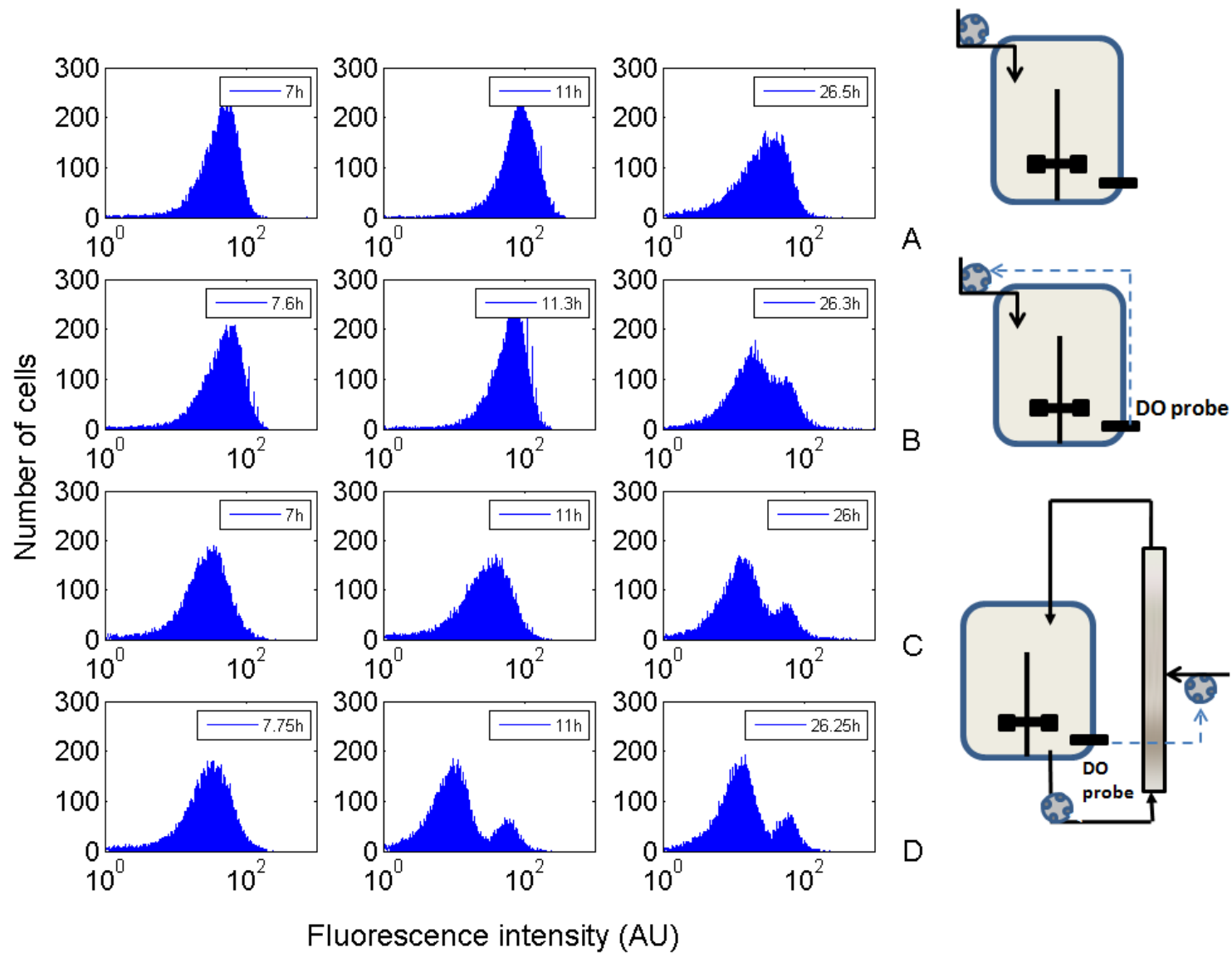




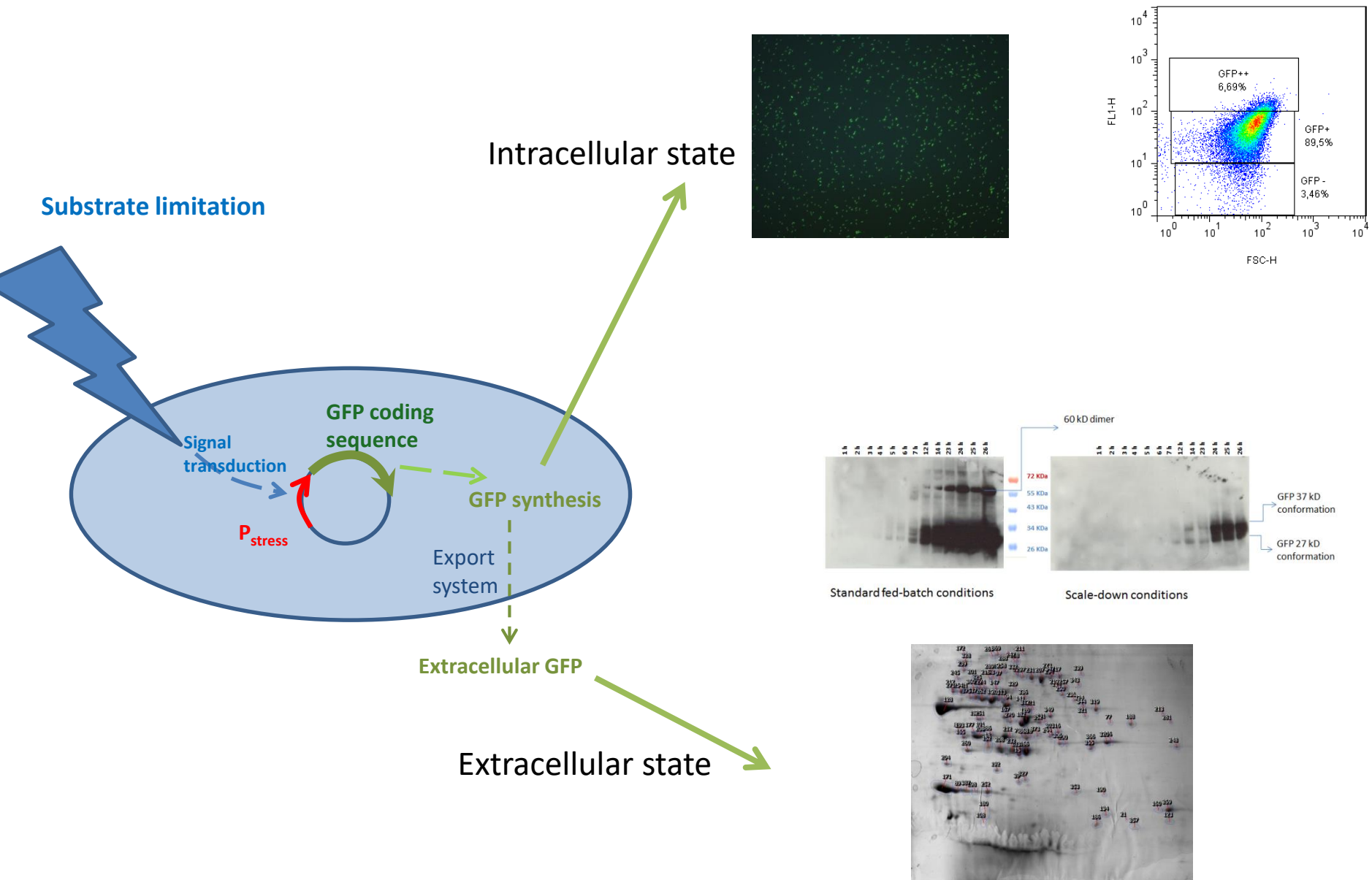
Global mixing efficiency



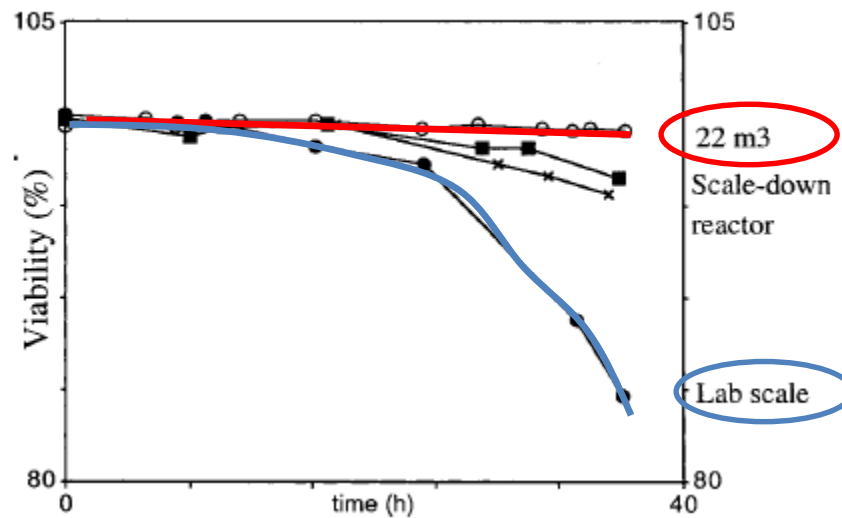
Global mixing efficiency



5. Influence du *scale-up* sur l'excrétion des protéines



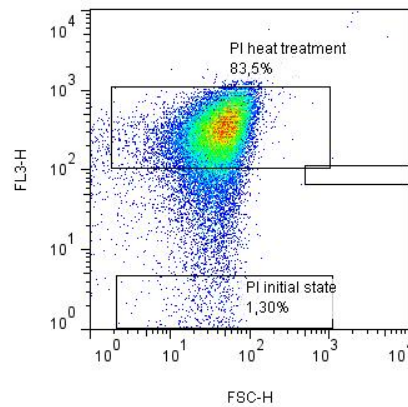
Effet bénéfique des fluctuations environnementales : maintien de la viabilité microbienne



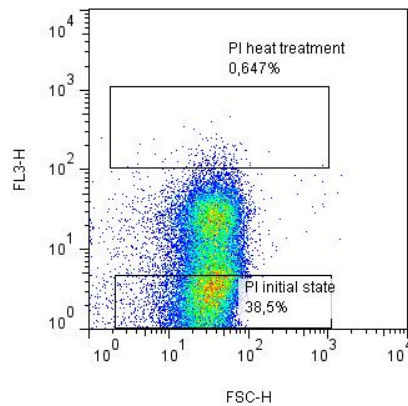
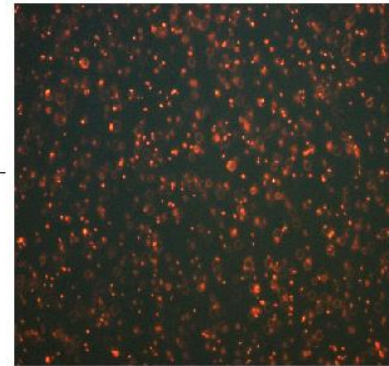
Enfors *et al.* [2001] *J. Biotech*, **85**, 175-185

Analyses effectuées par cytométrie en flux après coloration à l'iodure de propidium

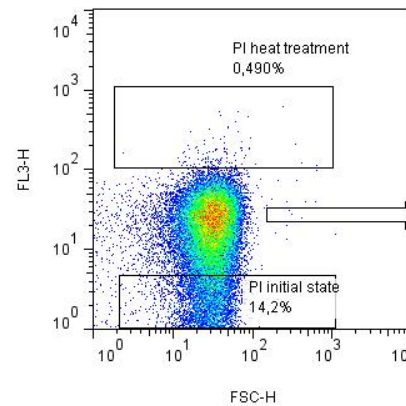
Test de coloration à l'iodure de propidium



Heat stressed cells



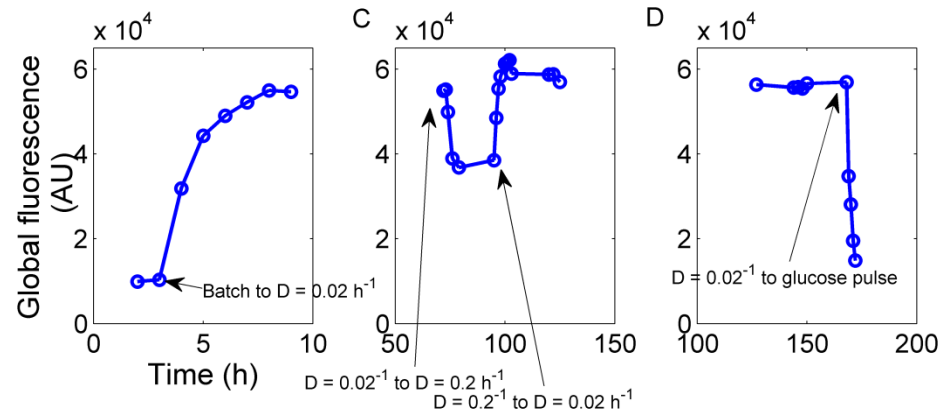
Chemostat D = 0.02 h⁻¹ (7h)



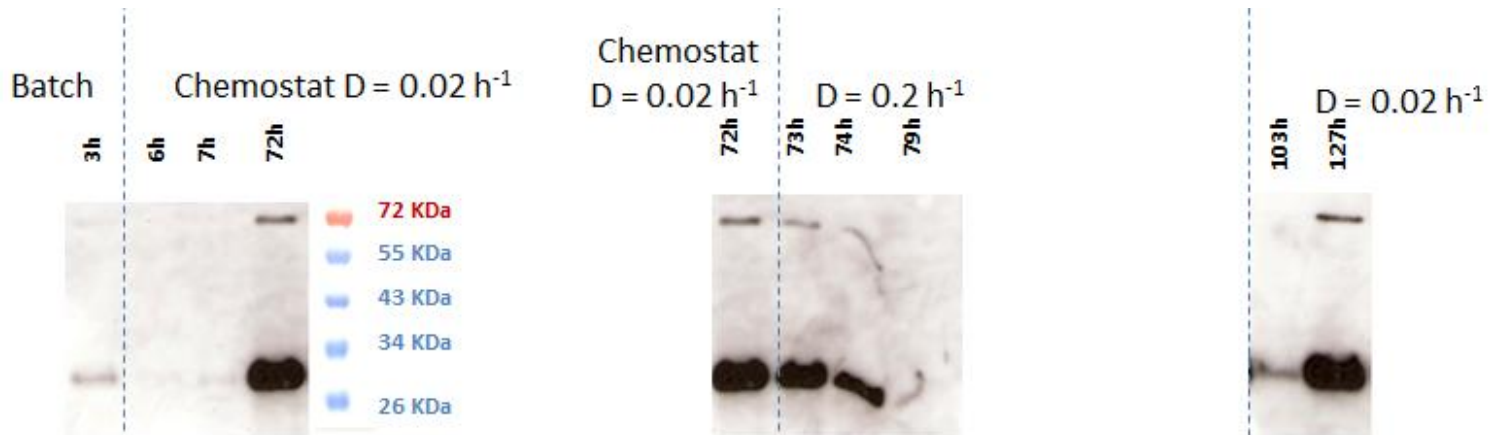
Chemostat D = 0.02 h⁻¹ (72h)



Global GFP production in chemostat mode

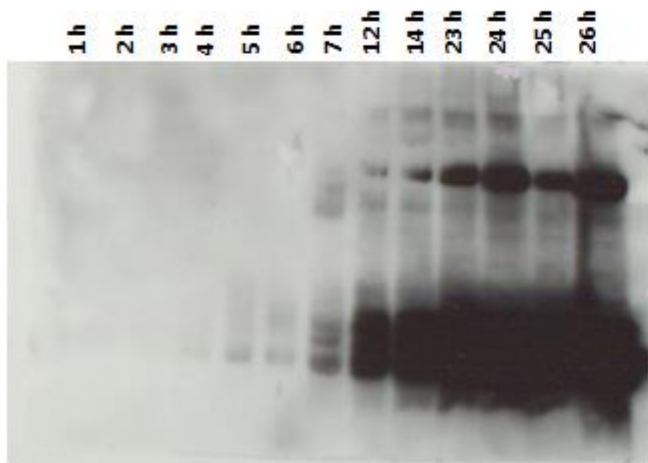


GFP leakage to the extracellular medium

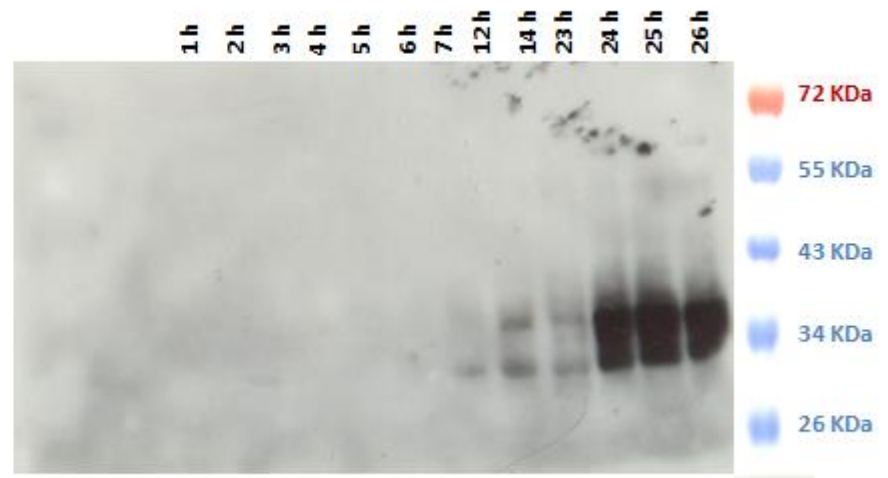


GFP extracellulaire

Standard fed-batch conditions

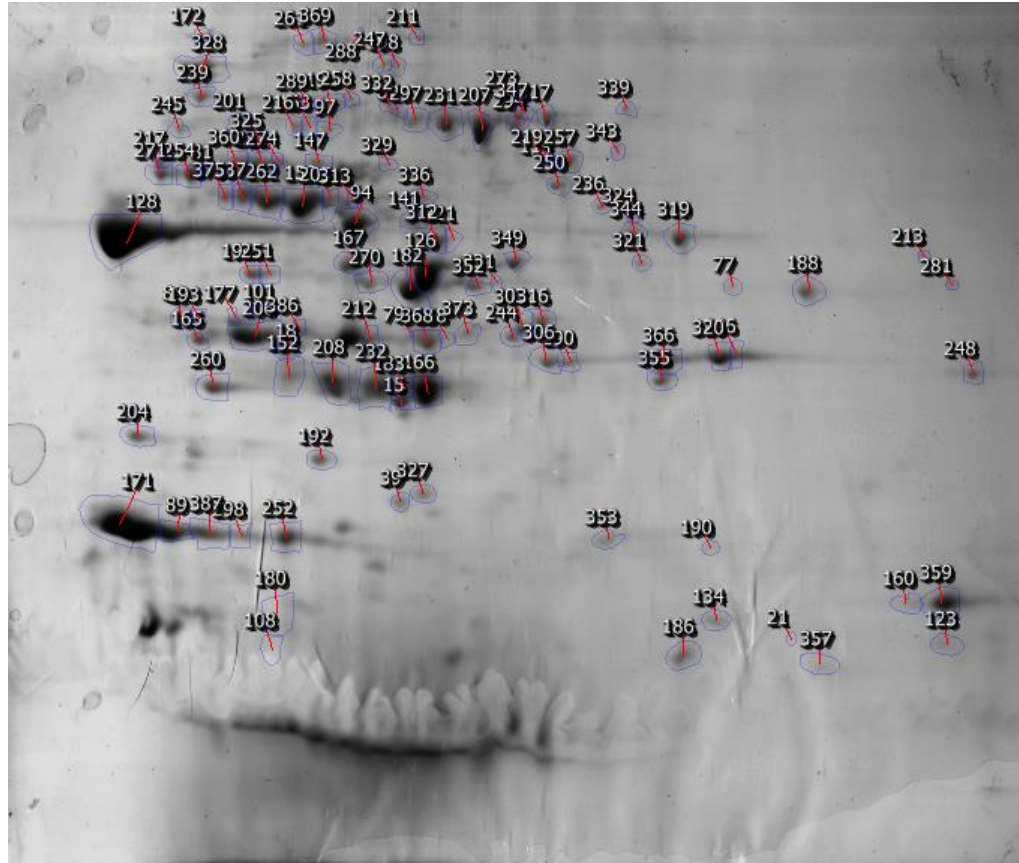


Scale-down conditions



Secretomic analysis of the impact of bioreactor performances

2-D gel electrophoresis performed on a fed-batch bioreactor (cell density around 40 g/L)



110 spots analyzed by MALDI-MS

Merci de votre attention

Pour plus d'informations :

- Delvigne *et al.* [2011] *Biochem. Eng. J.*, **55**, 131-139
- Delvigne *et al.* [2011] *Biotech. J.*, **8**, 968-978

